

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 12 January 2001 (12.01.01)	
International application No. PCT/JP00/03687	Applicant's or agent's file reference 12133
International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)
Applicant TAKAHASHI, Atsushi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 25 October 2000 (25.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 12133	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03687	国際出願日 (日.月.年) 07.06.00	優先日 (日.月.年) 07.06.99
出願人(氏名又は名称) 北興化学工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20 //(C12P19/02, C12R1:64), (C12P19/02, C12R1:38), (C12P19/02, C12R1:02),
(C12P19/02, C12R1:18), (C12P19/02, C12R1:425) (C12P19/02, C12R1:21), (C12P19/02, C12R1:01),
(C12N1/20, C12R1:64), (C12N1/20, C12R1:38), (C12N1/20, C12R1:18)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA (STN),
WPI/BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5406005, A (PICCARIELLO T.) 11.4月.1995 (11.04.95) (ファミリーなし)	1-21
A	DE, 3405663, A (MERCK PATENT GMBH) 22.8月.1985 (22.08.85) & JP, 60-248637, A	1-21
A	EP, 477001, A (ASAHI KASEI KOGYO KK, TOYO JOZO KK) 25.3月.1992 (25.03.92) & JP, 04-126075, A & US, 5356790, A	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.09.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

甲斐 順子

印

4 N

9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . . . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Paul P Hipps et al., "Identification and Partial Characterization of Inositol:NAD ⁺ Epimerase and Inosose:NAD(P)H Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, <i>Periplaneta americana</i> L. ", BIOCHEMISTRY, (1973), Vol. 12, No. 23, p. 4705-4712	1-21

REC'D 28 SEP 2001

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 12133	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03687	国際出願日 (日.月.年) 07.06.00	優先日 (日.月.年) 07.06.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ¹ C12P19/02、C12N1/20		
出願人 (氏名又は名称) 北興化学工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.10.00	国際予備審査報告を作成した日 14.09.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 木村 順子 印	4N 9641
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



;

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-21	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-21	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-21	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: US 5406005 A(PICCARIELLO T.) 11.4月.1995 (11.04.95)

文献2: DE 3405663 A(MERCK PATENT GMBH) 22.8月.1985 (22.08.85)

文献3: EP 477001 A (ASAHI KASEI KOGYO KK、TOYO JOZO KK)
25.3月.1992 (25.03.92)

文献4: BIOCHEMISTRY, 1973, Vol. 12, No. 23, p. 4705-4712.

請求の範囲1-21に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1-4に対して進歩性を有する。

文献1-4には、ミオーイノシトールに微生物を作用させて、L-エピー-2-イノソースに変換させることからなる、L-エピー-2-イノソースの製造方法、並びに、上記方法によって製造されたL-エピー-2-イノソースに、還元剤を作用させて、エピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させることからなる、エピーイノシトールの製造方法は記載されておらず、しかもそのことが、文献1-4から、当業者にとって容易に想到し得たこととも認められない。



1/1 ST
Translation
09/980453

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 12133	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03687	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 19/02, C12N 1/20		RECEIVED MAR 29 2002
Applicant HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.		TECH CENTER 1600/2900

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 October 2000 (25.10.00)	Date of completion of this report 14 September 2001 (14.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03687

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03687

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: US, 5406005, A (Piccariello T.), 11 April, 1995 (11.04.95)

Document 2: DE, 3405663, A (Merck Patent GmbH), 22 August, 1985 (22.08.85)

Document 3: EP, 477001, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd. and Toyo Jozo K.K.), 25 March, 1992 (25.03.92)

Document 4: Biochemistry, 1973, Vol. 12, No. 23, pages 4705-4712

The subject matters of claims 1-21 appear to involve an inventive step in view of documents 1-4 cited in the ISR.

Documents 1-4 do not describe a method of producing L-epi-2-inosose, comprising the step of letting a microbe act on myo-inositol for conversion into L-epi-2-inosose, or a method of producing epi-inositol, comprising the step of letting a reducing agent act on the L-epi-2-inosose produced by the aforesaid method, to produce epi-inositol and myo-inositol, and a person skilled in the art could not have easily conceived of these methods from documents 1-4 either.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 14 日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75355 A1

(51) 国際特許分類: C12P 19/02, C12N
1/20 // (C12P 19/02, C12R 1:64) (C12P 19/02, C12R
1:38) (C12P 19/02, C12R 1:02) (C12P 19/02, C12R 1:18)
(C12P 19/02, C12R 1:425) (C12P 19/02, C12R 1:21)
(C12P 19/02, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:64) (C12N
1/20, C12R 1:38) (C12N 1/20, C12R 1:18)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03687

(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 7 日 (07.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/159861 1999 年 6 月 7 日 (07.06.1999) JP
特願平 11/340523 1999 年 11 月 30 日 (30.11.1999) JP
特願 2000/151709 2000 年 5 月 23 日 (23.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北興化学工業株式会社 (HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8341 東京都中央区日本橋本石町四丁目 4 番 20 番 Tokyo (JP). 財団法人 微生物化学研究会 (ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI) [JP/JP]; 〒141-0021 東京都品川区上大崎 3 丁目 14 番 23 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 高橋 篤 (TAKAHASHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒214-0021 神奈川県川崎市多摩区宿河原 2 丁目 42 番 25-201 号 Kanagawa (JP). 神辺健司 (KANBE, Kenji) [JP/JP]; 〒227-0047 神奈川県横浜市青葉区みたけ台 7 番地 16 Kanagawa (JP). 森哲也 (MORI, Tetsuya) [JP/JP]. 北 雄一 (KITA, Yuichi) [JP/JP]; 〒243-0023 神奈川県厚木市戸田 2385 番地 北興化学厚木寮 Kanagawa (JP). 玉村 健 (TAMAMURA, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒242-0007 神奈川県大和市中央林間 5 丁目 18 番 4 号 Kanagawa (JP). 竹内富雄 (TAKEUCHI, Tomio) [JP/JP]; 〒141-0022 東京都品川区東五反田 5 丁目 1 番 11 号 ニューフジマンション 701 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士 八木田茂, 外 (YAGITA, Shigeru et al.); 〒105-0003 東京都港区西新橋 1 丁目 1 番 15 号 物産ビル別館 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, IL, IN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROCESS FOR PRODUCING L-EPI-2-INOSOSE AND NOVEL PROCESS FOR PRODUCING EPI-INOSITOL

(54) 発明の名称: L-エピー-2-イノソースの新規製造法とエピーイノシトールの新規製造法

(57) Abstract: Novel methods whereby L-epi-2-inosose and epi-inositol, which are useful as various drugs or synthesis intermediates, can be efficiently produced from less expensive myo-inositol. Namely, a method wherein myo-inositol is treated with a gram-negative bacterium capable of converting myo-inositol into L-epi-2-inosose to thereby convert the myo-inositol into L-epi-2-inosose. The L-epi-2-inosose thus obtained is further reacted in an aqueous reaction medium with a reducing agent comprising an alkali metal boron hydride or another alkali metal hydride to form epi-inositol and myo-inositol. Next, the epi-inositol is separated and isolated from the reduction reaction mixture comprising epi-inositol and myo-inositol to give epi-inositol.

[続葉有]

WO 00/75355 A1



(57) 要約:

各種の医薬あるいは合成中間体として有用なＬ－エピー２－イノソースとエピーイノシトールとを、安価なミオーイノシトールから効率よく製造できる新方法が提供された。すなわち、ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオーイノシトールに作用させて、ミオーイノシトールのＬ－エピー２－イノソースへの変換によりＬ－エピー２－イノソースを生成する新規方法が開発された。さらに、こうして得たＬ－エピー２－イノソースを、水性反応媒質中で水素化ホウ素アルカリ金属またはその他のアルカリ金属水素化物よりなる還元剤と反応させて、エピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させ、しかも得られたエピーイノシトールとミオーイノシトールよりなる還元反応生成物からエピーイノシトールを分離および単離することから成るエピーイノシトールの新規な製造方法が提供される。

明細書

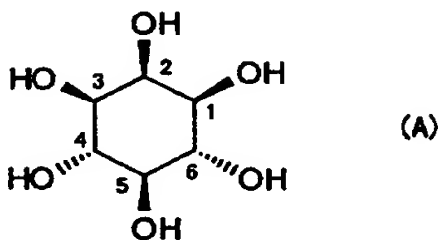
L-エピ-2-イノソースの新規製造法とエピーイノシ
トールの新規製造法

技術分野

- 5 本発明は、安価なミオーイノシトール (myo-Inositol) を原料として用い、それ自体が生物活性を有して且つ医薬品、等の合成の原料としても価値の高いL-エピ-2-イノソース (L-epi-2-Inosose) を、化学合成工程を経ず、微生物の作用下に一段階で製造する方法に関する。
- 10 また本発明はL-エピ-2-イノソースを還元して、それ自体が生物活性を有し医薬品として有用なエピーイノシトール (epi-Inositol) を効率良く製造する方法に関する。

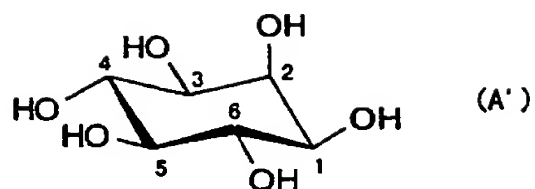
背景技術

- 15 ミオーイノシトールは次の平面式 (A)



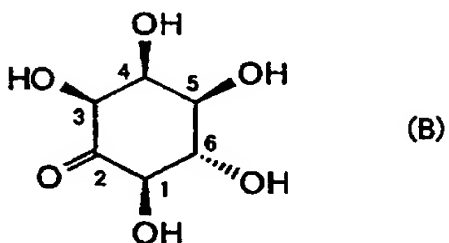
または次の立体構造式 (A')

2

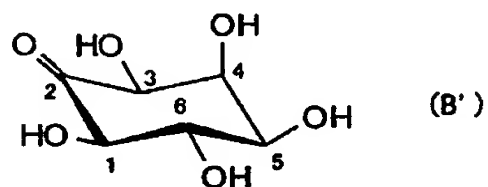


で表される天然に産する既知の物質である。

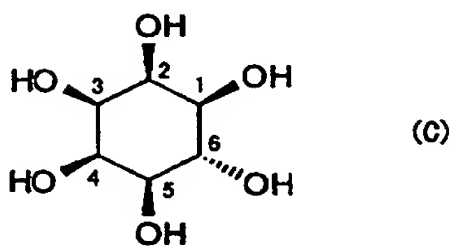
また、L-エピー-2-イノソースは次の平面式 (B)



5 または次の立体構造式 (B')

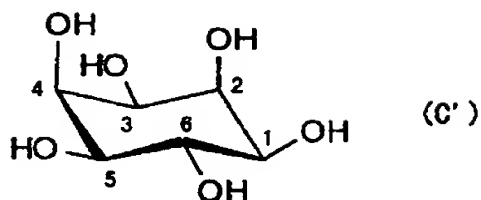


で表される既知の物質である。さらに、エピーイノシトールは次の平面式 (C)



3

または次の立体構造式 (C')



で表される既知の化学合成物質である。エピーイノシトールはミオーイノシトールの立体異生体の一つである。

- 5 イノソース (Inososes, 別名では Pentahydroxycyclohexanones または Alicyclic ketohexoses) は一般的にイノシトールの微生物的酸化 [A. J. Kluyver & A. Boezaardt: 「Rec. Trav. Chim.」 58 巻、956 頁 (1939)]、酵素的酸化 [L. Anderson 等: 「Arch. Biochem. Biophys.」 78 巻、518 頁 (1958)]、
- 10 白金触媒を用いた空気酸化 [K. Heyns and H. Paulsen: 「Chem. Ber.」 86 巻、833 頁 (1953)]、硝酸等の酸化剤による酸化 [T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」 19 巻、1333 頁 (1936)] によって合
- 15 成されることが知られている。

イノシトールのうち、ミオーイノシトールの微生物的酸化あるいは酵素的酸化で生成するイノソースとしては、これまでシローイノソース (別名ミオーイノソース-2) が知られているのみである [A. J. Kluyver & A.

- 20 Boezaardt: 「Rec. Trav. Chim.」 58 巻、956 頁

(1939)、L. Anderson等：「Arch. Biochem. Biophys.」78巻、518頁(1958)}。ミオーイノシトールを酸化してL-エピー-2-イノソースを生成できる微生物はこれまで報告されていない。

- 5 L-エピー-2-イノソースは、D-キローイノシトール(DCIと略記される)の合成原料として有用である(米国特許第5,406,005号)。このDCIはインシュリン抵抗性糖尿病の治療薬として有用であり(WO90/10439号公報)、あるいは多嚢胞性卵巣症候群の
- 10 改善薬として利用される[J. E. Nestler等：「NEW Engl. J. Med.」340巻、1314頁(1999)]ことが期待されている。このL-エピー-2-イノソースの製法としては、①ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のDL-エピー-2-イノソース
- 15 ((±)-エピー-2-イノソース)を、酸化白金触媒の存在下に水素で還元してエピーイノシトールを生成し、その後細菌のアセトバクター・サブオキシダンス(*Acetobacter suboxydans*)によるエピーイノシトールの微生物的酸化を行うことにより、L-エピー-2-イノソ
- 20 ースを合成する方法の報告がある[T. Posternak：「Helv. Chim. Acta」29巻、1991頁(1946)]。また、②D-グルクロン酸を出発原料にして化学合成したグルコジアルドースをアシロイン縮合して生成する化合物の一つとしてL-エピー-2-イノソースが合成され

るという報告がある(米国特許第5,406,005号)。

イノシトールは、シクロヘキサンから誘導される6価アルコールの総称であり、イノシトールには9種の立体異生体が存在する。天然産イノシトールにはミオーイノシトール、D-キローイノシトール、L-キローイノシトール、ムコーイノシトール、シローイノシトールの5種のイノシトールが見出されている。その他のイノシトールにはエピーイノシトール、アローイノシトール、ネオーイノシトール、シスーイノシトールがあり、これら4種のイノシトールは非天然型の化学合成されたイノシトールである。非天然型のイノシトールのうち、エピーイノシトールはうつ病、不安症の改善薬としての利用が期待されている[R. H. Belmaker等のPCT出願PCT/I L/00523号の国際公開明細書WO99/22727号及びR. H. Belmaker等:「Int. J. Neuropsychopharmacol.」1巻、31頁(1998)参照]。

このエピーイノシトールの製法としては、(1)ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のD, L-エピー-2-イノソースを酸化白金触媒の存在下で水素で還元してエピーイノシトールを合成する方法[T. Posternak:「Helv. Chim. Acta」29巻、1991頁(1946)]と、(2)シクロヘキサジエンの2価アルコールをオスミウム酸で酸化してエピーイノシトールを合成する方法[T. Tschamber等:「Helv. Chim. Acta」

75 巻、 1052 頁 (1992)] と、 (3) テトラヒドロベンゾキノンに水素添加してエピーイノシトールを合成する方法 (L. Odier: EP 特願公開 524082 号公報) と、 (4) ムコーイノシトールを適当に保護し、
5 酸化、還元の組合せによりエピーイノシトールを合成する方法 [K. E. Espelie 等: 「Carbohydrate Res.」 46 巻、 53 頁 (1976)] がある。また、グルコースあるいはガラクトースの F e r r i e r 環化反応及び適当な還元剤での還元反応の組合せによりエピーイノシトール
10 を合成する方法 [高橋等: 「有機合成化学協会誌」 58 巻、 120 頁 (2000)] もある。

しかしながら、これら既知の L-エピー-2-イノソースの製造方法、およびエピーイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で製造する方法としては、操作の煩
15 雑さ、環境汚染あるいは経済性の面で問題があるので、従来法は全て必ずしも満足し得るものではない。従って、工業規模で簡便に且つ効率良く L-エピー-2-イノソースを製造する新しい方法、及び簡便に効率良くエピーイノシトールを製造する新しい方法が要望されている。本
20 発明の目的は、このような要望に合致して種々の利点を有する L-エピー-2-イノソース及びエピーイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねてきた。その結果、安価に入手できるミオーイノシ

トールに対して、本発明者等により土壌から新たに分離した細菌の新しい菌株であるキサントモナス・エスピー
5 A B 1 0 1 1 9 株を水性の媒質中で作用させると、式
（A）または（A'）で表されるミオーイノシトールの
4位の水酸基のみをほぼ選択的に酸化（または脱水素）で
きて、式（B）または（B'）のL-エピー-2-イノゾ
ースが生成することを見出した。この生成されたL-エ
10 ピー-2-イノゾースを単離し、核磁気共鳴スペクトル装
置、質量分析装置、旋光度計などにより機器分析を実施
した結果、この物質は光学純度の高いL-エピー-2-イ
ノゾースであることが判明した。

更に、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノゾー
15 スに変換できる活性または能力を有する微生物を広く自
然界から探索したところ、グラム陰性細菌、例えばシュ
ードモナダセア（Pseudomonadaceae）科のキサントモナ
ス（Xanthomonas）属またはシュードモナス（Pseudomon
as）属の細菌；およびアセトバクテラセア（Acetobacte
20 raceae）科のアセトバクター（Acetobacter）属またはグ
ルコノバクター（Gluconobacter）属の細菌；およびリゾ
ビアセア（Rhizobiaceae）科のアグロバクテリウム（Ag
robacterium）属の細菌；エンテロバクテリアセア（Ente
robacteriaceae）科のエルウィニア（Erwinia）属、エン

テロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、エルシニア (Yersinia) 属の細菌；およびパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌

5 に属するグラム陰性細菌である分類学的に広範な範囲のグラム陰性細菌のうちに、上記のミオーイノシトールを酸化して L-エピー-2-イノソースへ変換できる活性または能力を有する菌株が存在することが明らかになった。これらの中でもミオーイノシトールを酸化して L-エピー-2-イノソースへ変換できる高い活性または能力を有する菌株の例として、具体的には、上記に記載のキサントモナス・エスピー AB 10119 株があり、これ以外に、土壌から新たに本発明者らが分離した細菌の新しい菌株であるシュードモナス・エスピー AB 1021

10 5 株、あるいはエルウィニア・エスピー AB 10135 株があげられる。

上記した知見に基づいて、L-エピー-2-イノソースの新しい製造方法が後記の通り工夫された。すなわち、ミオーイノシトール並びに通常の炭素源及び窒素源を含有する液体培地、あるいは通常の炭素源を特に含有しないでミオーイノシトール（これの一部が炭素源となる）と窒素源（窒素源が有機質の窒素源である場合、これの一部も培養条件によっては炭素源になる）とを含有する

20 液体培地中で上記のキサントモナス・エスピー AB 1

0 1 1 9 株あるいはシュードモナス・エスピー A B 1
0 2 1 5 株あるいはエルウィニア・エスピー A B 1 0
1 3 5 株、等を好氣的に培養すると、これにより、得ら
れた培養液中で、ミオーイノシトールからＬ－エピー 2
5 ーイノソースを生成させ且つこれを蓄積するようにして
Ｌ－エピー 2 ーイノソースを効率よく製造できることが
知見された。また、Ｌ－エピー 2 ーイノソースの上記の
新しい製造方法では、培養液中に蓄積したＬ－エピー 2
ーイノソースは、培養液から使用微生物の菌体の除去後
10 に、得られた培養上清液を陽イオン交換樹脂、陰イオン
交換樹脂等のイオン交換樹脂処理あるいは活性炭処理あ
るいは結晶化操作にかけることにより、あるいはこれら
処理の組合せにかけるとにより、高純度なＬ－エピー
2 ーイノソースとして効率良く回収できることが知見さ
15 れた。

さらに、本発明者等が別途の研究を行った結果、上記
のように培養液中で生成および蓄積されたＬ－エピー 2
ーイノソースを含む培養液から、菌体を除去し、そして
その後、得られた培養上清液に、直接に、適当な量の水
20 素化ホウ素ナトリウムまたはこれと均等な水素化物の他
の還元剤を添加して、培養上清液中でＬ－エピー 2 ーイ
ノソースに該還元剤を反応させる場合に、Ｌ－エピー 2
ーイノソースがエピーイノシトールに効率よく還元され
ることが知見された。すなわち、培養上清液からＬ－エ

ピー 2 - イノソースは単離されなくとも、培養上清液内で上記還元剤との反応により L - エピー 2 - イノソースはエピーイノシトールに効率良く還元され得ることが見出された。

5 さらに、上記のキサントモナス・エスピー A B 1 0
1 1 9 株に代表されるところの、ミオーイノシトールを酸化により L - エピー 2 - イノソースに変換できる能力を有するグラム陰性細菌でミオーイノシトールを処理する
10 方法、並びに得られた培養上清液から生成された L -
エピー 2 - イノソースを単離せずに、培養上清液中で L -
エピー 2 - イノソースを適当な還元剤で処理してエピー
イノシトールを生成し収得する方法について種々の実験を本発明者等は行った。その結果、多くの知見が得られた。それらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。
15 た。

従って、第 1 の本発明においては、ミオーイノシトールを L - エピー 2 - イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトールに作用させて、それにより前記ミオーイノシトールを L - エピー 2 - イノソースへ変換させて L - エピー 2 - イノソースを生成することをから成ることを特徴とする、L - エピー 2 - イノソースの製造方法が提供される。
20

第 1 の本発明による L - エピー 2 - イノソースの製造方法は、具体的には、以下に示す (A) 及び (B) の 2

つの実施方法で行うことができる。

実施方法（A）は、上記のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースに変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養し、その培養液中にＬ－エ
5 ピー２－イノソースを生成蓄積させて培養液を取得する工程と、得られた培養液から菌体を除去し、そして生成蓄積させたＬ－エピー２－イノソースを、得られた培養上清液から、イオン交換樹脂処理、活性炭処理または結
10 晶化操作あるいはそれらの処理などの組合せにより、回収する工程とを含む方法である。

実施方法（B）は、上記能力を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離する工程と、該菌体を、溶解されたミオーイノシトールを含む緩衝液
15 または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、得られた反応液中にＬ－エピー２－イノソースを生成させる工程と、反応液に生成蓄積させたＬ－エピー２－イノソースを、反応液から
20 イオン交換樹脂処理、活性炭処理または結晶化操作あるいはこれら処理の組合せにより、回収する工程とを含む方法である。

第１の本発明の方法において使用する微生物は、ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースに変換する活性または能力を有する微生物であれば、いずれの菌株

でも良い。

具体的に例示すると、前述したようにミオーイノシトールから L-エピー-2-イノソースを生産できる菌には多種の細菌が存在する。例えば本発明者らが分離した前
5 記の A B 1 0 1 1 9 株、A B 1 0 2 1 5 株、A B 1 0 1 3 5 株は本発明方法に最も有効に使用される細菌の例である。前記の 3 種の菌株の菌学的性質を後記の表 1 a、表 1 b、表 1 c、表 1 d に示した。

尚、前記の 3 種の菌株の同定を行うに当たっては、新
10 細菌培地学講座（第 2 版、近代出版）、医学細菌同定の手引き（第 2 版、近代出版）、細菌学実習提要（丸善）に準じて、同定のための実験を行った。また、得られた実験結果を Bergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1（1984）を参考に評価して、菌株の同定
15 を行った。

[表 1 a]

形態的特徴		ABI0119株	ABI0215株	ABI0135株
(1) 細胞形態 :		桿菌で大きさは0.4~0.6×0.6~4.0μm。多形性がある。	桿菌で、大きさは0.3~0.5×0.6~6.5μm。多形性がある。	桿菌で、大きさは0.4~0.6×0.8~2.0μm。多形性は無い。
(2) 運動性 :		-	-	-
(3) 普通寒天培地上での生育状態		生育は中程度。コロニー形態は円形、平滑で光沢がある。色調は黄土色~黄色。	生育は旺盛。コロニー形態は円形、平滑で光沢がある。色調は黄土色。	生育は微量。コロニー形態は円形、平滑で光沢がある。色調は乳白色。
(4) 最少培地 (炭素源グルコース) での生育状態		生育は微量。	生育は旺盛。	生育せず。
生理生化学的性状				
(1) グラム染色 :		-	-	-
(2) OFテスト		0 (Oxidative)	0 (Oxidative)	F (Fermentative)
(3) 好気条件での生育 :		+	+	+
(4) 嫌気条件での生育 :		-	-	+(weak)
(5) 生育温度 :				
8℃		-	-	-
10℃		-	-	+
13℃		+	+	+
17℃		+	+	+
21℃		+	+	+
37℃		+	+	+
40℃		+	+	-
42℃		-	-	-
47℃		-	-	-
(6) 食塩耐性 :				
0%		+	+	+
2%		+	+	+
5%		-	-	+
10%		-	-	-

[表 1 b]

	ABI0119株	ABI0215株	ABI0135株
生理生化学的性状			
(7) 生育pH :			
pH3	-	-	-
pH4	-	-	+
pH5	+	+	+
pH6	+	+	+
pH7	+	+	+
pH8	+	+	+
pH9	+(weak)	+(weak)	+
pH10	-	-	+(weak)
(8) 色素の産生 :			
マニッ酵母エキス寒天培地(不溶性色素の検出用)	菌体が薄い黄土色～黄色に着色	菌体が僅かに黄色に着色	-
King培地(水溶性色素の検出用)	寒天中に薄い黄色の色素を産生	寒天中に薄い黄色の色素を産生	-
(9) チコロムオキザンゼの産生	-	-	-
(10) カラージュの産生 :	+	+	+
(11) 硝酸塩の還元性	-	+	+
(12) 硫化水素の産生 :	-	-	-
(13) アミノ酸の産生 :	+	-	+
(14) ケラチンの液化	+	+	+
(15) Tween 80の分解 :	+	+	-
(16) イノシトールの産生 :	-	-	-
(17) アラニン酸の利用性 :	-	-	-
(18) ONPGの分解性 :	+	+	+
(19) エクリンの分解性 :	+	+	+

[表 1 c]

	AB10119株	AB10215株	AB10135株
生理生化学的性状			
(20)デキストロースアゼーゼ活性:	+	+	-
(21)ケエン酸利用性:	+	+	-
(22)アミ酸に対するデカルボキシアーゼ活性:			
L-リジン	-		-
L-アルギニン	-	-	-
L-オルニチン	-		-
(23)尿素分解性:	-	-	-
(24)テトラヒミド分解性:	-	-	-
(25)リナシムク:	凝固せず	凝固せず	凝固せず
(26)澱粉の分解:	-	-	-
(27)色素及び薬剤感受性試験:			
0.01%リナシムク	+	+	+
0.01%リナシムク	+	+	-
0.01%酢酸鉛	-	-	-
(28)各種糖類からの酸の生成:			
グルコース	+	+	+
キシロース	+	+	+
マンノース	+	+	+
アラビノース	+	+	+
フルクトース	+	+	+
マルトース	+	+	+
ラクトース	-	-	-
マニトール	-	-	+
シュクロース	-	-	+
アデオール	-	-	-
ソール	-	-	-

【表 1 d】

生理生化学的性状	AB10119株	AB10215株	AB10135株
(28)各種糖類からの酸の生成:			
リビトール	-	-	-
α-ガラクトース	+	+	+
トレハロース	-	-	-
セロビオース	+	+	+
イヌリン	-	-	-
スルジトール	-	-	-
サリシン	+	-	-
ガラクトース	-	+	+
クリセロール	-	-	+
アラビノース	-	+	-
α-メチル-β-D-グルコース	-	-	-
(29)炭素源の質化性:			
グルコース	+	+	-
セロビオース	+	+	-
マルトース	+	+	-
ガラクトース	+	+	-
トレハロース	+	+	-
α-ガラクトース	+	+	-
D-フルクトース	+	+	-
ミオ-イノシトール	-	+	-
サリシン	-	+	-
レヒスチジン	+	+	-
レ-グルタミン酸	+	+	-
グリシン	-	-	-
バシリン酸	-	+	-
アスパギン	-	+(weak)	-
チオニン	-	+	-
(30)ユビキノンの分子種	Q8	Q8	Q8
(31)DNAのGC含量 (HPLC法)	68	68	50

AB10119株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌株はコロニーが黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは $0.4 \sim 0.6 \times 0.6 \sim 4.0 \mu\text{m}$ 。また、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、グルコースを好氣的に分解し酸を生成する。最少培地での本菌株の生育は悪いが、最小培地にメチオニンを添加すると良好な生育となる。硝酸塩の還元性は無く、0.01 %のメチルグリーン及びチアニンに感受性であった。本菌株の細胞のユビキノンの種はQ8で、DNAのGC含量は68 %であった。

これらの菌学的性質を総合して、AB10119株はキサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1 (1984) 199頁～210頁によると、キサントモナス属細菌には5種のスピーズ (キサントモナス・カンペストリス; キサントモナス・フラガリアエ; キサントモナス・アルブリネンス; キサントモナス・アキソノポディス; キサントモナス・アメリザ) が知られている。AB10119株の菌学的性状を上記の既知のスピーズと比較検討した結果、AB10119株はキサントモナス・カンペストリスに最も近縁の種とであると考えられた。しかし、本菌株の菌学的性質はキサントモナス・カンペストリスに完全には一致しなかったため、本AB10119株を公知のものと区別するため、

キサントモナス・エスビー AB10119株と命名し、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に在る工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17382として寄託した（寄託日は1999年5月7日）。さらに、2000年5月23日の寄託日で
5 前記の研究所にAB10119株はブダペスト条約の規約下にFERM BP-7168の受託番号で寄託された。

また、AB10215株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌体はコロニーが淡黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは $0.3 \sim 0.5 \times 0.6 \sim 6.5 \mu\text{m}$ 。また
10 本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、グルコースを好氣的に分解し酸を生成する。最少培地での本菌株の生育は良好であり、硝酸塩の還元性を有する。
0.01 %のメチルグリーン及びチアニンに感受性であった。本菌株の細胞のユビキノンの種はQ8で、DNA
15 のGC含量は68%であった。

これらの菌学的性質を総合すると、AB10215株はBergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (1984) 140頁～199頁に記載されているシュードモナス・マルトフィリアに最も近縁な種であると考えられる。しかし、AB10215株は、その菌学的性質においてシュードモナス・マルトフィリアに完全には合致しなかったため、本菌株を公知のものと区別するため、シュードモナス・エスビー AB10215と命名し、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に在る工業技術院生命工学工業技術研究所に
20

FERM P-17804として寄託した（寄託日2000年3月31日）。さらに、2000年5月23日の寄託日で前記の研究所にAB10215株はブダペスト条約の規約下にFERM BP-7170の受託番号で寄託された。

- 5 一方、AB10135株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌株はコロニーが乳白色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは $0.4 \sim 0.6 \times 0.8 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 。本菌株はグルコースを好氣的・嫌氣的のいずれの条件でも分解し酸を生成するが、好氣的条件での生育に比べて嫌氣的
- 10 条件での生育は非常に悪い。また、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性である。普通寒天培地での本菌株の生育は微量であるが、普通寒天培地に5%シェークロースを添加すると非常に旺盛な生育を示す。本菌株の細胞のユビキノンの種はQ8で、DNAのGC含量は50%であ
- 15 った。

これらの菌学的性質を総合して、AB10135株はエルウィニア(Erwinia)属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (1984) 469頁～476頁によると、エルウィニア属細菌は15種に分類されているが、AB10135株はいずれの種とも、その菌学的性質において完全には合致しなかった。従って、AB10135株を公知のものと区別するため、エルウィニア・エスピー AB10135と命名し、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に在る工業技術院生

命工学工業技術研究所に F E R M P - 1 7 8 0 3 とし
て寄託した（寄託日は 2 0 0 0 年 3 月 3 1 日）。さらに、
2 0 0 0 年 5 月 2 3 日の寄託日で前記の研究所に A B 1
0 1 3 5 株はブダベスト条約の規約下に F E R M B P
5 - 7 1 6 9 の受託番号で寄託された。

以下に、第 1 の本発明の方法の前記した実施方法（A）
～（B）をより詳しく説明する。

実施方法（A）では、ミオーイノシトールならびに炭
素源および窒素源を含む栄養液体培地で、ミオーイノシ
10 トールを L - エピ - 2 - イノソースに変換できる能力を
有する微生物を好氣的に培養し、その培養液中に、L -
エピ - 2 - イノソースを生成蓄積させる第 1 工程が行わ
れる。

ここに用いる液体培地の組成は、目的を達する限り何
15 ら特別の制限はない。用いる液体培地は、L - エピ - 2
- イノソースへの変換原料であるミオーイノシトールを
含み、これに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無
機塩類等を含有する培地であればよい。合成培地または
天然培地のいずれも使用できる。用いる液体培地は、ミ
20 オーイノシトールを 0.1% ～ 40%、より好ましくは 20 ～
30% 含有し、炭素源としては、グルコース、シュークロ
ース、マルトースあるいは澱粉を 0.1% ～ 20%、より好ま
しくは 0.5 ～ 5% を含有し、また窒素源としては、酵母エ
キス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化

- アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を
0.01%～5.0%、好ましくは0.5%～2.0%含有するのが望
ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カ
ルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、
5 鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成
することができる無機塩類を培地中に添加することが有
効である。得られる培養液中の水素イオン濃度をpH4～
10、好ましくはpH5～9に調整しながら、菌を培養する
と、効率よくL-エピー-2-イノソースを生成できる。
- 10 菌の培養条件は、用いた菌株や培地の種類によっても
異なるが、培養温度は5～40℃、好ましくは20～37℃で
ある。また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地
中に空気を吹き込むなどして好氣的に行うのが好ましい。
培養期間は、培養液中でミオーイノシトールが完全に消
15 失し、且つ生成されたL-エピー-2-イノソースが最大
の蓄積量を示すまでの期間であるのが良く、通常1～14
日、好ましくは3～10日である。上記の第1工程によっ
て、L-エピー-2-イノソースを含む培養液が得られる。
- 次に、培養液から目的のL-エピー-2-イノソースを
20 採取する第2工程が行われる。この採取には、培養液か
ら通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を
応用することができる。すなわち、L-エピー-2-イノ
ソースを含む培養液から先づ菌体を除去し、その後、培
養上清液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理するが、こ

- れらの方法により、L-エピー-2-イノソース以外の不純物を培養上清液からほとんど除くことができる。しかし、イオン交換樹脂処理には、強塩基性陰イオン交換樹脂のOH⁻型はL-エピー-2-イノソースを化学変化させるので使用することはできない。その後、こうして活性炭またはイオン交換樹脂で処理された培養上清液から、L-エピー-2-イノソースは、結晶化および必要に応じて再結晶する方法等を用いることにより、目的生成物として単離することができる。
- 10 前記の培養上清液からL-エピー-2-イノソースを回収するためには、より具体的には、L-エピー-2-イノソースを蓄積、含有した培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）C-20（H⁺型）を充填したカラムに通過させて、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通
- 15 過させ洗浄して洗浄液を集め、先に得られた通過液と洗浄液を合併し、その合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）A368S（遊離塩基型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通
- 20 過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、L-エピー-2-イノソースを含むがそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を収得するのが好ましい。この水溶液を濃縮して、得られたL-エピー-2-イノソース

の濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なＬ－エピー２－イノソースの結晶を晶出できる。

第１の本発明方法の前記した実施方法（Ｂ）では、所望の能力を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離し、該菌体を、ミオーイノシトールを含む緩衝液または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、得られた反応液中にＬ－エピー２－イノソースを生成させる諸工程が行われる。

上記のミオーイノシトールと菌体との反応工程で用いる菌体としては、実施方法（Ａ）の第１工程により得た培養液から分離して集めた菌体を用いてもよく、また、前記微生物を別途の工程で適当な培養条件で培養して得た菌体を用いてもよい。集菌は、培養液を遠心分離、濾過等にかけて菌体を分離する公知の方法により行えばよい。

ミオーイノシトールと菌体を反応させるための反応媒質としては、液体培地または緩衝液が用いられる。液体培地としては、実施方法（Ａ）の第１工程において用いたものと同様の組成のものを用いてもよい。また別途に前記微生物を培養した後に、その培養液から菌体を除去して得られた培養上清液よりなる液体培地を、そのまま用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス

緩衝液、グッド（Good's）のCHES緩衝液等を10～500mM、好ましくは20～100mMの濃度で用いればよい。緩衝液または液体培地にとかされたミオーイノシトールの溶液中のミオーイノシトールの当初の濃度は0.1～40
5 %（重量）程度とするのが好ましい。

ミオーイノシトールと菌体との反応条件は、菌株や培地、緩衝液の種類によって異なるが、反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3～48時間である。液体培地または緩衝液の
10 pHは2～10、好ましくは3～9である。

ミオーイノシトールと菌体との反応の終了後に、得られた反応液からの目的物質のL-エピー-2-イノソースを単離する方法は実施方法（A）の第2工程と同様に行えばよい。

15 第2の本発明においては、ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールのL-エピー-2-イノソースへの変換によりL-エピー-2-イノソースを該水性媒質中に生
20 成させ、これにより微生物菌体とL-エピー-2-イノソースとを含有する反応液を収得し、次いで該反応液から菌体を除去してL-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液を収得し、さらに得られたL-エピー-2-イノソース含有の反応液ろ液に適当な還元剤を直接に添加し

て該還元剤をＬ－エピー２－イノソースに作用させてエピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させることから成ることを特徴とする、エピーイノシトールの製造方法が提供される。

- 5 第２の本発明の方法は、具体的には、以下に示す（Ｃ）、（Ｄ）及び（Ｅ）の３つの実施方法で行うことができる。

- 第２の本発明方法の実施方法（Ｃ）は、ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、第１の本発明方法の実施方法（Ａ）に記載の微生物培養方法と同様な要領により、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地よりなる水性媒質中で好氣的に培養しながら、該微生物を培養液中でミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中にミオーイノシトールのＬ－エピー２－イノソースへの変換により、Ｌ－エピー２－イノソースを生成し且つ蓄積させて培養液を収得する工程（第１工程）と、反応液として得られた培養液から該微生物の菌体を除去して、その後、得られたＬ－エピー２－イノソースを単離せずに、Ｌ－エピー２－イノソースを含有する反応液ろ液として得られた培養上清液を収得する工程（第２工程）と、該培養上清液に対して直接に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤でＬ－エピー２－イノソースを還元する反応を
- 10
- 15
- 20

行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該培養上清液内で生成する工程(第3工程)と、
こうして得られたところの還元反応の反応液、すなわち
生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを
5 含有する培養上清液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程(第4工程)と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程(第5工程)とからなる方法である。

第2の本発明方法の実施方法(D)は、ミオーイノシ
10 トールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物を第1の本発明方法の実施方法(B)に記載の微生物培養方法と同様な要領により、炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養して該微生物の培養液を収得し、さらに該培養液から該微生物の菌体を
15 分離する工程(第1工程)と、こうして得られた微生物菌体を水性の緩衝液または液体培地よりなる水性媒質中でミオーイノシトールと反応させて、L-エピー-2-イノソースを生成させる工程(第2工程)と、こうして得られたところの、該微生物菌体と生成されたL-エピー-2-
20 イノソースとを含有する反応液から菌体を除去して、これにより、微生物菌体を除去されたL-エピー-2-イノソースを含有する得られた反応液ろ液を収得する工程(第3工程)と、この反応液ろ液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アル

カリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、
該還元剤をＬ－エピー－２－イノソースに作用させて還元
する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミ
オーイノシトールを該反応液ろ液内で生成する工程（第
5 4 工程）と、生成されたエピーイノシトール及びミオー
イノシトールを含有するその還元反応の反応液から、エ
ピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程
（第 5 工程）と、回収されたエピーイノシトールとミオー
イノシトールを相互から分離する工程（第 6 工程）とから
10 なる方法である。

第 2 の本発明方法の実施方法（E）は、上記の実施方
法（C）及び（D）における還元剤を添加してＬ－エピー
－２－イノソースを還元剤で還元する工程を行う前に、
Ｌ－エピー－２－イノソースを含有する培養上清液または
15 反応液濾液よりなる水性媒質の pH を、pH 8 ～ 12 の範囲の
アルカリ性に予め調整する工程を行い、その後、Ｌ－エ
ピー－２－イノソースを含有する pH 8 ～ 12 の水性媒質に還
元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアル
コキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカ
20 リ金属を添加して該還元剤をＬ－エピー－２－イノソース
に作用させて還元する反応を行うことから成る方法であ
る。実施方法（E）により、副成されたミオーイノシト
ールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシ
トールを生成させるようにして、エピーイノシトールが

製造される。

第 2 の本発明方法で使用する微生物は、第 1 の本発明方法で用いられたところの、ミオーイノシトールを L-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物と同じであることができる。

以下に、第 2 の本発明の方法の前記した実施方法 (C) ~ (E) をより詳しく説明する。

第 2 の本発明方法の前記の実施方法 (C) では、要約すると、ミオーイノシトールを含む液体栄養培地に、所望の能力を有する微生物を接種して好氣的に培養することにより、培養液中に L-エピー-2-イノソースを生成蓄積させて培養液を収得する第 1 工程と、培養液から微生物菌体を除去して、L-エピー-2-イノソースを含有する培養上清液を収得する第 2 の工程と、その後に培養上清液から L-エピー-2-イノソースを単離せず、該培養上清液に適当な還元剤を直接に添加し、L-エピー-2-イノソースの還元反応を行う第 3 工程と、こうして得られた還元反応の反応液から生成されたエピーイノシトールを回収する第 4 工程とが行われる。

すなわち、第 2 の本発明方法の実施方法 (C) において、所望の能力を有する微生物をミオーイノシトール含有の液体培地で培養しながら培養液中に L-エピー-2-イノソースを生成、蓄積させて培養液を収得する第 1 工程が先ず行われるが、この第 1 工程は、第 1 の本発明方

法の実施方法（A）の第1工程と全く同様に行うことができる。

実施方法（C）の第2工程では、第1工程で得られた培養液から菌体を除去してL-エピー-2-イノソースを
5 含有する培養上清液を収得する工程を行う。その後、第3工程では、得られた培養上清液に直接に還元剤として水素化物を添加して還元反応を行う。これによって、培養上清液内でL-エピー-2-イノソースからエピーイノシトール及びミオーイノシトールが生成される。使用さ
10 れる還元剤は、水系中でL-エピー-2-イノソースをエピーイノシトールに還元できる還元剤として、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムであるのが望まし
15 い。還元反応は0℃～室温で行う。L-エピー-2-イノソースの消失した時点または反応生成物の生成量が適当になった時点で還元反応を終了する。これによって、生成されたエピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する培養上清液が還元反応の反応液として第3工程
20 で得られる。

ここで得られた還元反応の反応液である培養上清液から、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを回収する第4の工程を次に行う。この第4の回収工程では、第3工程から得られてエピーイノシトール及びミオーイ

ノシトールを含有する培養上清液を、不望成分の除去の
目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登
録商標）C-20（ H^+ 型）を充填したカラムに通過させ、
通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過さ
5 せ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を
合併し、その合併された溶液を強塩基性陰イオン交換樹
脂、例えばデュオライト（登録商標）A113（ OH^-
型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その
後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を
10 集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、エピーイ
ノシトール及びミオーイノシトールを含みそれ以外の不
純物をほとんど含まない水溶液を収得するのが好ましい。

実施方法（C）の最終（第5）工程では、先の第4工
程で回収されたエピーイノシトール及びミオーイノシト
15 ールの水溶液からエピーイノシトールとミオーイノシト
ールを別々に分離する。これらの生成物の分離のため
には、前記のエピーイノシトールとミオーイノシトールの
水溶液を減圧下に濃縮し、その濃縮液を強塩基性陰イ
オン交換樹脂、例えばアンバーライト（登録商標）CG-4
20 00（ OH^- 型）を充填したカラムに通過させ、その後こ
のカラムに脱イオン水を通過させることによって該カラ
ムを溶出し、これによって、ミオーイノシトールを主と
して含有する溶出液画分と、目的とするエピーイノシト
ールを含有する溶出液画分とを別々に得ることが好まし

い。このエピーイノシトールを含む水溶液を濃縮して、得られたエピーイノシトールの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なエピーイノシトールの結晶を晶出できる。

5 なお、実施方法（C）において、上記の還元終了後に、生成されたエピーイノシトールを含む培養上清液を、直列された複数のイオン交換樹脂カラムで処理する第4工程を行うと、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有するが、その他の不純成分をほとんど含有しない
10 水溶液が得られる。このエピーイノシトールとミオーイノシトールの水溶液を濃縮し、得られた濃縮液を、スルホン酸基を交換基とするスチレン重合体よりなる強酸性陽イオン交換樹脂（ Ca^{2+} 型）、例えばダイヤイオン（登録商標）UBK 520M（ Ca^{2+} 型）のカラムに通
15 して、カラムにエピーイノシトール及びミオーイノシトールを吸着させ、ついでカラムを脱イオン水で溶出するようにして第5工程を行う場合には、ミオーイノシトールからエピーイノシトールを効率よく分離できることが本発明者等によって見出されている。

20 第2の本発明方法の前記の実施方法（D）では、要約すると、栄養液体培地で所望の能力を有する微生物を接種して好氣的に培養し、得られた培養液から微生物菌体を分離し、これにより、該菌体を大量に収得する第1工程と、こうして得られた該菌体を、緩衝液あるいは液体

培地よりなる水性媒質中で、これに溶解させたミオーイ
ノシトールに作用させて、Ｌ－エピー２－イノソースを
生成させる第２工程と、ここで得られた反応液から菌体
を除去して、菌体が除去されたＬ－エピー２－イノソー
5 スを含有する反応液ろ液を得る第３工程と、Ｌ－エピー
２－イノソースを単離せず、該反応液ろ液に適当な還元
剤を添加し、Ｌ－エピー２－イノソースの還元反応を行
い、これによりエピーイノシトールとミオーイノシトール
を生成する第４工程と、こうして得られた還元反応液
10 から、生成されたエピーイノシトールとミオーイノシト
ールを回収する第５工程と、回収されたエピーイノシト
ールをミオーイノシトールから分離する第６工程とが行
われる。

この実施方法（Ｄ）の第１工程では、使用される所望
15 の変換能を有する微生物を、微生物の培養に常用される
液体培地で好氣的に培養し、得られた培養液から該微生物
の菌体を分離する。この様に分離された菌体を実施方法
（Ｄ）の第２工程で使用する。菌体としては、実施方法
（Ａ）の第１工程により得た培養液から菌体を分離して
20 集めた菌体を用いても良い。また、前記の使用微生物を
別途の工程により適当な培養条件で培養して得た菌体を
用いてもよい。菌体の分離と集菌は、培養液を遠心分離、
濾過等の公知の手段にかけることにより行えば良い。

実施方法（Ｄ）の第２工程において、菌体をミオーイ

ノシトールに反応させるための液体反応媒質としては、緩衝液または液体培地よりなる水性媒質が用いられる。液体培地としては、実施方法（A）の第1工程で用いたものと同様のものを用いても良い。緩衝液としては、リン酸緩衝液、グッド（Good's）のCHES緩衝液等を10
5 ～500mM、好ましくは20～100mMの濃度で用いれば良い。ここで用いた水性の反応媒質にとかしたミオーイノシトールの濃度は、0.1～30%（重量）の程度とするのが望ましい。菌体とミオーイノシトールとの反応条件は、使用菌株や使用された反応媒質の緩衝液または液体培地の種類によって異なる。反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3
10 ～48時間である。水性反応媒質として用いられる緩衝液または液体培地のpHはpH2～10、好ましくは3～9である。該第2工程で微生物菌体をミオーイノシトールと反応させると、L-エピー-2-イノソースを含有する反応液が得られる。

実施方法（D）の第3工程では、第2工程で得られたL-エピー-2-イノソース含有反応液から遠心分離、濾過等の公知の手段により菌体を除去し、これによってL-エピー-2-イノソースを含有する反応液濾液を収得する。次の第4工程では、第3工程で得られたところの、
20 菌体を除かれたL-エピー-2-イノソース含有の反応液濾液に対して、還元剤としての水素化物を添加して、L

ーエピー２ーイノソースの還元反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを生成する。この第４工程の還元反応は、実施方法（Ｃ）の第３工程で説明したと同じ要領で行いうる。

- 5 次いで、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する還元反応液からエピーイノシトール及びミオーイノシトールをそれらの水溶液として回収する第５工程を行う。その後、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する水溶液からエピーイノシトールを
10 収得する第６工程を行う。これら第５及び第６工程は、先に実施方法（Ｃ）の第４工程および第５工程で説明した手法と同様に実施できる。

- さらに第２の本発明方法の前記した実施方法（Ｅ）においては、第３の本発明方法の実施方法（Ｃ）の第２工
15 程ならびに実施方法（Ｄ）の第４工程を行うに先立ち、すなわちＬーエピー２ーイノソースを含有した前記の培養上清液あるいは反応液濾液にアルカリ金属水素化物型の還元剤を添加して還元反応を行う工程に先立ち、還元剤を添加する前に、予め前記の培養上清液あるいは反応
20 液濾液を、水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムあるいは炭酸ナトリウムあるいは炭酸カリウムの添加によりpH 8－11、望ましくはpH 9－10に調整して置く工程を行い、そして、その後還元剤を添加し還元反応を行うのである。このようにアルカリ性に反応媒質のpHを調整

することにより、反応媒質のpHを未調整（通常pH5 - 7）で還元反応を行う場合（通常エピーイノシトール6 ~ 7部に対しミオーイノシトール3 ~ 4部が生成する）と比較すると、生成するエピーイノシトールの量が1.3 ~ 1.5
5 倍に増加し、副成するミオーイノシトールの量が1 / 2 ~ 1 / 4に減少することが本発明者の別途の研究で知見された。実施方法（E）によると、pH8 ~ 11の水性媒質中で、L - エピー2 - イノソースを前記の水素化物で還元することによって、副成されたミオーイノシトールの
10 生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシトールを生成させることができる。

前記のA B 1 0 1 1 9株、A B 1 0 2 1 5株およびA B 1 0 1 3 5株は新規な微生物であって、ミオーイノシトールからL - エピー2 - イノソースを生産できる有用
15 性を有する。従って、第3の本発明においては、ミオーイノシトールをL - エピー2 - イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にF E R M B P - 7 1 6 8の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスピーA B 1 0 1 1 9株が新規微生物として
20 提供される。

また、第4の本発明においては、ミオーイノシトールをL - エピー2 - イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にF E R M B P - 7 1 7 0の受託番号で寄託されたシュードモナス・エス

ピー A B 1 0 2 1 5 株が新規微生物として提供される。

さらに、第 5 の本発明においては、ミオーイノシトールを L - エピ - 2 - イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所に F E R M B P
5 - 7 1 6 9 の受託番号で寄託されたエルウィニア・エスピー A B 1 0 1 3 5 株が新規微生物として提供される。

第 1 の本発明および第 2 の本発明によれば、医農薬合成原料として有用な純度の高い L - エピ - 2 - イノソースと、医薬として有用なエピーイノシトールとがそれぞれ
10 れに工業生産規模で安価に且つ簡便に製造することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を下記の実施例について具体的に説明する。

15 実施例 1

(a) 第 1 の本発明の実施方法 (A) による L - エピ - 2 - イノソースの製造例 (1)

(1) L - エピ - 2 - イノソースの生成 (第 1 例)

ミオーイノシトール 12.0% (360 g)、酵母エキス
20 1.2%、(N H ₄) ₂ S O ₄ 0.1%、K ₂ H P O ₄ 0.7%、
K H ₂ P O ₄ 0.2%、M g S O ₄ · 7 H ₂ O 0.01% を含む pH 7 の液体培地 3 リットルを、100ml ずつ 500ml 容のバツフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー

A B 1 0 1 1 9 株 (F E R M B P - 7 1 6 8 の 受 託 番
号 で 寄 託) を 接 種 し、27℃で3日間振とう培養した。培
養液を遠心分離 (8,000rpm、20分間) し、培養上清液を
得た。

- 5 この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより
下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL
-エピー-2-イノソースが66mg/mlの濃度で生成してい
る (ミオ-イノソースからL-エピー-2-イノソースへ
の変換率55.6%) ことがわかった。この時の培養上清液
10 中にミオ-イノシトールは検出されなかった。

なお、上記のL-エピー-2-イノソースへの変換率は、
次の計算式により求めた。

- 変換率 (%) = [培養上清液 1 ml 中の L - エピー - 2 -
イノソースのモル数 ÷ 液体培地 1 ml 中のミオ-イノシト
15 ールのモル数] × 100

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通
りである。

カラム : Wakosil 5NH₂ : 4.6 × 350mm

カラム温度 : 40℃

- 20 検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR.
INC.)

注入量 : 20 μl

溶媒 : アセトニトリル - 水 = 4 : 1

溶出時間 : L - エピー - 2 - イノソース ;

6.7分

(2) L-エピー-2-イノソースの生成 (第2例)

ミオーイノシトール 25.0% (250mg/ml)、グルコース 1.0%、酵母エキス 0.7%を含むpH未調整の液体培
5 地400mlを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラス
コに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラ
スコにキサントモナス・エスピー A B 1 0 1 1 9 株 (F
E R M B P - 7 1 6 8 の受託番号で寄託) を接種し、
27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離
10 (8,000rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより
前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL
-エピー-2-イノソースが247mg/mlの濃度で生成してい
る(変換率99.9%)ことがわかった。この時の培養上清液
15 中にミオーイノシトールは検出されなかった。

なお、上記のL-エピー-2-イノソースへの変換率は、
前記の計算式により求めた。

(3) L-エピー-2-イノソースの生成 (第3例)

ミオーイノシトール 4.0% (40mg/ml)、酵母エキ
20 ス 0.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4
0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.01%を含むpH7の液体培地100mlを500ml容のバッフル
付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。
この三角フラスコにエルウィニア・エスピー A B 1 0 1

35株 (FERM BP-7169の受託番号で寄託) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより
5 前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが22mg/mlの濃度で生成している (変換率55.6%) ことがわかった。この時の培養上清液中にミオーイノシトールは検出されなかった。

なお、上記のL-エピー-2-イノソースの変換率は、
10 前記の計算式により求めた。

(4) L-エピー-2-イノソースの生成 (第4例)

ミオーイノシトール 25.0% (250mg/ml)、グルコース 1.0%、酵母エキス 0.7%を含むpH未調整の液体培
地100mlを、500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注
15 し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにシュードモナス・エスピーAB10215株 (FERM BP-7170の受託番号で寄託) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離 (8,000rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

20 この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エピー-2-イノソースが244mg/mlの濃度で生成している (変換率98.7%) ことがわかった。この時の培養上清液中にミオーイノシトールは検出されなかった。

(b) L-エピ-2-イノソースの回収と単離

上記の実施例 1 (2) で得た培養上清液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20 (H⁺型) 80mlを充填したカラム(内径 2 cm、長さ 30 cm)に通過させ、その後このカラムに 80ml のイオン交換水(脱イオン水)を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を、合併して、合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)368S (遊離塩基型) 160mlを充填したカラム(内径 3 cm、長さ 30 cm)に通過させ、その後このカラムに 160ml のイオン交換水を通過させて洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液中には、上記 L-エピ-2-イノソースが含有される以外に、不純物はほとんど存在していなかった。

上記の合併により得た水溶液を減圧下で 200ml まで濃縮した。その濃縮液にエタノールを 3 倍量加え 5℃で一晩放置したところ、純粹な L-エピ-2-イノソースの無色結晶を 60 g 得た。この時の精製品の回収率は 60.7%、ミオ-イノシトールからの L-エピ-2-イノソースの全回収率は 60.6% であった。

なお、上記 L-エピ-2-イノソースの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率 (%) = [精製単離した L-エピ-2-イノソース量 ÷ 培養上清液 400ml 中に含まれた精製前の

Ｌ－エピ－２－イノソースの量〕×100

また、上記Ｌ－エピ－２－イノソースの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（％）＝〔精製単離したＬ－エピ－２－イノ
5 ソースのモル数÷液体培地400ml中に含有されたミオー
イノシトールのモル数〕×100

実施例 2

第 1 の本発明の実施方法（A）によるＬ－エピ－２－ イノソースの製造例（2）

10 （1）種培養物の調製

ミオーイノシトール 2.0％、酵母エキス 0.2％、
（NH₄）₂SO₄ 0.1％、K₂HPO₄ 0.7％、
KH₂PO₄ 0.2％、MgSO₄・7H₂O 0.01％を含む
pH7の液体培地100mlを500ml容のバッフル付き三角フラ
15 スコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フ
ラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株（FERM
BP-7168）を接種し、27℃で1日間振と
う培養した。この培養液を種培養物として用いた。

20 （2）4L容ジャーフェーマンターによるＬ－エピ－２ －イノソースの製造

ミオーイノシトール 12.0％、酵母エキス 1.2％、
（NH₄）₂SO₄ 0.1％、K₂HPO₄ 0.7％、
KH₂PO₄ 0.2％、MgSO₄・7H₂O 0.01％を含む
pH7の液体培地2.5リットルを、4L容ジャーフェーマン

ターに分注し、オートクレーブ滅菌した。このジャーファーマンターにキサントモナス・エスピー A B 1 0 1 1 9 株の、上記(1)の方法で調製した種培養物 25ml を接種した。この後、培養温度は 27℃、通気量は 1 vvm、回転数は 200rpm で培養を実施した。培養は 3 日間行い、培養期間中の pH を 5 M N a O H 水溶液及び 3 M 塩酸で 7 ± 0.2 に自動調整した。3 日間培養後の培養液を遠心分離 (8,000rpm、20 分間) し、上清を培養上清液として得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記と同様の条件で分析した。この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中には L-エピー-2-イノソースが 60mg/ml の濃度で生成している(変換率 50.6%)ことがわかった。

反応液からの L-エピー-2-イノソースの単離方法は、実施例 1 (b) に記載した方法に準じて行い、結晶として 114 g (精製品回収率 76.0%) を得た。また、この時のミオーイノシトールからの L-エピー-2-イノソースの全回収率は 38.4% であった。

なお、上記 L-エピー-2-イノソースの変換率は、上記実施例 1 に準じた計算式で求め、また精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率 (%) = [精製単離した L-エピー-2-イノソース量 ÷ 培養上清液 2.5 リットル中に含有された

精製前の L-エピー-2-イノソース量] × 100

また、上記 L-エピー-2-イノソースのミオーイノシトールからの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率 (%) = [精製単離した L-エピー-2-イノ
5 ソースのモル数 ÷ 培地 2.5 リットル中に含有されたミオーイノシトールのモル数] × 100

実施例 3

第 1 の本発明の実施方法 (B) による L-エピー-2-イノソースの製造例

10 (1) 菌体の生産

ミオーイノシトール 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、
 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% を含む pH 7 の液体培地 2 L を 500 ml 容
のバッフル付き三角フラスコに 100 ml ずつ分注し、オート
15 クレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー AB 10119 株 (FERM BP-7168) を接種し、27℃ で 3 日間振とう培養した。この培養液を遠心分離して菌体を得た。得られた菌体を、0.05
M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 ml で洗浄後、再度遠心分離
20 し、洗浄菌体を得た。

(2) L-エピー-2-イノソースの製造

上記により得られた洗浄菌体 35 g を、ミオーイノシトール 4 g を含有した 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 400 ml (ミオーイノシトール濃度は 10 mg/ml) 中に加えた。

得られた混合物を30℃、24時間緩やかにスターラーで攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ、L-エピー-2-イノソースが6 mg/ml(変換率60.7%)の濃度で生成、蓄積していた。反応液からのL-エピー-2-イノソースの単離方法は、実施例1(b)に記載した方法に準じて行い、結晶として1.6 g(精製品回収率66.7%)を得た。また、上記L-エピー-2-イノソースのミオーイノシトールからの全回収率は40.4%であった。

- 10 なお、上記のL-エピー-2-イノソースの変換率は、上記実施例1に準じて求め、精製品回収率は次の計算式により求めた。

$$\text{精製品回収率 (\%)} = [\text{精製単離したL-エピー-2-イノソース量} \div \text{反応液400ml中の精製前のL-エピー-2-イノソース量}] \times 100$$

また、上記L-エピー-2-イノソースのミオーイノシトールからの全回収率は次の計算式により求めた。

$$\text{全回収率 (\%)} = [\text{精製単離したL-エピー-2-イノソースのモル数} \div \text{緩液400ml中に添加したミオーイノシトールのモル数}] \times 100$$

実施例 4

第2の本発明の実施方法(C)によるエピーイノシトールの製造例

(1) L-エピー-2-イノソースの生成

ミオーイノシトール 25.0% (500 g)、グルコース 1.0%、酵母エキス 2.5%を含むpH未調整の液体培地 2 リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー A B 1 0 1 1 9 株 (FERM P-7168) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離(8,000rpm、20分間)し、培養上清液を得た。

この培養上清液を実施例 1、(1) に示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、培養上清液中には L-エピー-2-イノソースが 415 g (ミオーイノシトールから L-エピー-2-イノソースへの変換率は 83.9%) 生成していることがわかった。

(2) エピーイノシトールの生成

前項 (1) で得た L-エピー-2-イノソース含有の培養上清液の 2 リットルに還元剤としての水素化ホウ素ナトリウムの 29.2 g を徐々に加えた。還元反応を室温で行った。反応の終了後、培養上清液(還元反応の反応液)を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、還元反応後の反応液(培養上清液)は、生成したエピーイノシトールの 235.8 g を含有し、副生成物として、ミオーイノシトールの 102.4 g を含有していることがわかった(エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率は 80.6%)。L-エピー-2-イノソース

からのエピーイノシトールの変換率は56.2%であった。

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム : Wakosil 5 NH₂ : 4.6×250mm

5 カラム温度 : 40℃

検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A

(ERMA CR. INC.)

注入量 : 20 μl

溶媒 : アセトニトリル-水 = 4 : 1

10 溶出時間 : エピーイノシトール ; 8.5分

なお、エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率(%)は次式で計算した。

〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計÷還元反応前の培養上清液中のL-エピー-2-イノソースのモル数〕
15 ×100

また、上記のL-エピー-2-イノソースからエピーイノシトールへの変換率は次の計算式により求めた。

変換率(%) = 〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数÷還元反応前の培養上清液中のL-エピー-2-イノソースのモル数〕 ×100
20

(3) エピーイノシトールの回収と単離の1例

前項(2)で得た還元反応後の反応液(培養上清液)を二等分した。一方の上清液を強酸性陽イオン交換樹脂デ

デュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)300mlを充填したカラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させ、その後このカラムに400mlのイオン交換水を通して洗浄した。この通過液及び洗浄液を合併して、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH⁻型)600
5 mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)に通過させ、その後このカラムに700mlのイオン交換水を通して洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併した。ここで合併により得られた水溶液は、エピーイノシトールと副生成物としてのミオーイノシトールとを含有するが、
10 これら以外に不純物をほとんど含有しなかった。

上記により得た水溶液を減圧下で300mlまで濃縮した。その濃縮液(300ml)の4分の1量(75ml)を、強塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライト(登録商標)CG-400(OH⁻型)1500mlを充填したカラム(内径5cm、長さ200cm)に通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通して溶出した。該カラムの溶出液はミオーイノシトールを主として含む画分と、所望なエピーイノシトール
15 を主として含む画分とに分け集めた。前記の濃縮液の残りの4分の3(225ml)についても同様な操作を行うことにより、エピーイノシトールを専ら含む溶出液を収得できた。これを濃縮乾固して、エピーイノシトールを73g得た。さらにこのエピーイノシトールを水に溶かし15%

20

の水溶液とした後、エタノールを2倍量加えて5℃で一晩放置して再結晶させた。こうして純粋なエピーイノシトールの結晶63gが得られた(精製品回収率53.4%)。ミ
5 オーイノシトールからのエピーイノシトールの全収率は25.2%であった。

なお、上記エピーイノシトールの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率(%) = [結晶として単離したエピーイ
ノシトールの量 ÷ 還元反応後の上清液中のエピーイノシ
10 トールの量] × 100

また、上記のミオーイノシトールからのエピーイノシトール全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率(%) = [結晶として単離したエピーイノシ
トールの量 ÷ 培地1リットルに含有されたミオーイノシ
15 トールの量] × 100

(4) エピーイノシトールの回収と単離の第2例

前項(3)で二等分された還元反応後の反応液(培養上清液)の残りの一方を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライ
イト(登録商標)C-20(H⁺型)300mlを充填したカラ
20 ム(内径5cm、長さ30cm)に通過させ、その後このカラ
ムに400mlのイオン交換水を通して洗浄した。この通過
液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライ
ト(登録商標)A-113(OH⁻型)600mlを充填したカ
ラム(内径5cm、長さ60cm)に通過させ、その後このカラ

ムに700mlのイオン交換水を通して洗浄した。

- 上記により通過液及び水洗浄液を合併して、合併により得られた水溶液を減圧下で300mlまで濃縮した。その濃縮液（300ml）を強酸性陽イオン交換樹脂ダイヤイオン
- 5 （登録商標）UBK 520M（Ca⁺型）1500mlを充填したカラム（内径5cm、長さ200cm）に通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通して溶出した。該カラムの溶出液はミオーイノシトールを主として含む画分と、所望なエピーイノシトールを主として含む画分とに分け集
- 10 めた。このクロマトグラフィー操作でエピーイノシトールを75g得た。さらにこのエピーイノシトールを水に溶かし15%の水溶液とした後、エタノールを2倍量加えて5℃で一晩放置して再結晶させた。こうして純粋なエピーイノシトールの結晶66g（精製品回収率56.0%）を得た。
- 15 この時の出発原料として用いたミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は26.4%であった。

なお、上記エピーイノシトールの精製品回収率及び全回収率は前項（3）と同様に計算した。

実施例 5

- 20 第2の本発明の実施方法（C）および（E）によるエピーイノシトールの製造例

（1）L-エピー-2-イノソースの生成

ミオーイノシトール 25.0%、グルコース 1.0%、酵母エキス 0.7%を含むpH未調整の液体培地100mlを

500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー A B 1 0 1 1 9 株 (F E R M B P - 7 1 6 8) を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液
5 を遠心分離 (8,000rpm、20分間) し、培養上清液を得た。

この培養上清液を実施例 1、(1) に示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、培養上清液中には L - エピー 2 - イノソースが 23 g (ミオーイノシトールから L - エピー 2 - イノソースへの変換率 93.0
10 % に相当) の量で生成していることがわかった。

(2) エピーイノシトールの生成

前項 (1) で得た L - エピー 2 - イノソース含有の培養上清液 100ml に、5 M の水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH10 に調整した。その後、直ちに水素化ホウ素ナトリウム 1.3 g を pH10 の培養上清液に徐々に加えた。還元反応
15 を室温で行った。反応の終了後、培養上清液 (反応液) を高速液体クロマトグラフィーにより前記実施例 4、(2) 記載の条件で分析した。その結果、還元反応後の反応液 (培養上清液) は、生成したエピーイノシトールの 18.4 g
20 を含有し、副生成物として、ミオーイノシトールの 0.8 g を含有していることがわかった (エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率は 82.6 %) 。 L - エピー 2 - イノソースからのエピーイノシトールの変換率は 79.1 % であった。

この時のエピーイノシトールとミオーイノシトールへの合計反応収率は次の計算式により求めた。

エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率(%) = [還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の培養上清液中の L-エピー-2-イノソースのモル数] × 100

また、上記の L-エピー-2-イノソースからのエピーイノシトールへの変換率は次の計算式により求めた。

10 変換率(%) = [還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培養上清液中の L-エピー-2-イノソースのモル数] × 100

(3) エピーイノシトールの回収と単離

反応液からのエピーイノシトールの回収と精製、単離
15 は、実施例 4、(4)に記載した方法に準じて行った。エピーイノシトールの結晶として 15.7 g を得た。このときの反応液中のエピーイノシトールからの精製品回収率は 85.3% であった。反応液中の L-エピー-2-イノソースに基づくエピーイノシトールの収率は 67.5%、出発原料
20 として用いたミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は 62.8% であった。

なお、上記の反応液中のエピーイノシトールからのエピーイノシトールの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率（％）＝〔精製単離したエピーイノシトール量÷還元反応後の培養上清液100ml中に含有された精製前のエピーイノシトール量〕×100

また、上記のL-エピー-2-イノソースに基づくエピーイノシトールの収率は次の計算式により求めた。

収率（％）＝〔精製単離したエピーイノシトールのモル数÷還元反応前の培養上清液100ml中に含有された還元反応前のL-エピー-2-イノソースのモル数〕×100

また、上記のミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（％）＝〔精製単離したエピーイノシトール量÷培養開始時の培養液100ml中に含有されたミオーイノシトール量〕×100

産業上の利用可能性

15 本発明によれば、ミオーイノシトールから、医薬の合成用中間体として有用なL-エピー-2-イノソースが簡便に且つ効率よく製造できる。また、本発明によれば、ミオーイノシトールからL-エピー-2-イノソースが生成され、さらにL-エピー-2-イノソースの還元により、

20 各種の医薬として有用なエピーイノシトールが簡便に且つ効率よく製造できる。従って、本発明方法は産業上で有用である。

請求の範囲

1. ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトールに作用させて、それにより前記ミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換させてL-エピー-2-イノソースを生成することから成ることを特徴とする、L-エピー-2-イノソースの製造方法。
2. 請求の範囲1に記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物が細菌である、請求の範囲1に記載の方法。
3. 請求の範囲1に記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物がグラム陰性細菌である、請求の範囲1に記載の方法。
4. 請求の範囲1に記載のミオーイノシトールをL-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、グラム陰性細菌であり、シュードモナダセア (*Pseudomonadaceae*) 科に属するキサントモナス (*Xanthomonas*) 属またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属の細菌、あるいはアセトバクテラセア (*Acetobacteraceae*) 科に属するアセトバクター (*Acetobacter*) 属またはグルコノバクター (*Gluconobacter*) 属の細菌、あるいはリゾビアセア (*Rhizobiaceae*) 科に属するアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属の細菌、あるいはエンテロバクテリアセア (*Enterobacteriaceae*) 科に属するエルウィニア (*Erwin*

ia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia) 属の細菌、あるいはパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科に属するパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれるグラム陰性細菌である、請求の範囲 1 に記載の方法。

5 5. 請求の範囲 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピ-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、キサントモナス (Xanthomonas) ・エスビー A B 1 0 1 1
10 9 株 (FERM B P - 7 1 6 8 として寄託) あるいはシュードモナス (Pseudomonas) ・エスビー A B 1 0 2 1
5 株 (FERM B P - 7 1 7 0 として寄託) あるいはエルウィニア (Erwinia) ・エスビー A B 1 0 1 3 5 株 (FERM B P - 7 1 6 9 として寄託) である、請求の範囲
15 1 に記載の方法。

6. 請求の範囲 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピ-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養し、その培養液中において該微生物をミオーイノシトールに作用させて培養液中に L-エピ-2-イノソースを生成、蓄積させる、請求の範囲
20 1 に記載の方法。

7. 請求の範囲 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピ-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物を

培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離し、
該菌体を、溶解されたミオーイノシトールを含む緩衝液
または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミ
オーイノシトールと反応させ、得られた反応液中にＬ－
5 エピー２－イノソースを生成させる工程を含む、請求の
範囲１に記載の方法。

8. 請求の範囲６または７に記載の方法により、生成、
蓄積されたＬ－エピー２－イノソースを含有する培養液
または反応液を収得し、さらに該培養液または反応液か
10 ら、菌体を除去し、その後、菌体を除去されたＬ－エピ
ー２－イノソースを含有する培養上清液または反応液ろ
液を、イオン交換樹脂処理または活性炭処理または結晶
化操作あるいはこれらの組合せの処理にかけ、この処理
により、高純度のＬ－エピー２－イノソースを培養上清
15 液または反応液ろ液から回収することを特徴とする、請
求の範囲１に記載の方法。

9. ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ
変換できる能力を有する微生物を水性媒質中でミオーイ
ノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールのＬ
20 －エピー２－イノソースへの変換によりＬ－エピー２－
イノソースを該水性媒質中に生成させ、これにより微生
物菌体とＬ－エピー２－イノソースとを含有する反応液
を収得し、次いで該反応液から菌体を除去してＬ－エピ
ー２－イノソースを含有する反応液ろ液を収得し、さら

に得られた L-エピ-2-イノソース含有の反応液ろ液に適当な還元剤を直接に添加して該還元剤を L-エピ-2-イノソースに作用させてエピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させることから成ることを特徴とする、エピーイノシトールの製造方法。

10. 請求の範囲 9 に記載のミオーイノシトールを L-エピ-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物が細菌である、請求の範囲 9 に記載の方法。

11. 請求の範囲 9 に記載のミオーイノシトールを L-エピ-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物がグラム陰性細菌である、請求の範囲 9 に記載の方法。

12. 請求の範囲 9 に記載のミオーイノシトールを L-エピ-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、グラム陰性細菌であり、シュードモナダセア

15 (Pseudomonadaceae) 科に属するキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌、あるいはアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科に属するアセトバクター (Acetobacter) 属またはグルコノバクター (Gluconobacter) 属の細菌、あるいはリゾ
20 ビアセア (Rhizobiaceae) 科に属するアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌、あるいはエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科に属するエルウィニア (Erwinia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia)

属の細菌、あるいはパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科に属するパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれるグラム陰性細菌である請求の範囲 9 に記載の方法。

- 5 13. 請求の範囲 9 に記載のミオーイノシトールを L-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、キサントモナス (Xanthomonas) ・エスピー A B 1 0 1 1 9 株 (FERM BP-7 1 6 8 として寄託) あるいはシュードモナス (Pseudomonas) ・エスピー A B 1 0 10 2 1 5 株 (FERM BP-7 1 7 0 として寄託) あるいはエルウィニア (Erwinia) ・エスピー A B 1 0 1 3 5 株 (FERM BP-7 1 6 9 として寄託) である請求の範囲 9 に記載の方法。

- 15 14. 請求の範囲 9 に記載のミオーイノシトールを L-エピー-2-イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地よりなる水性媒質中で好氣的に培養しながら、該微生物をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中に L-エピー-2-イノソースを生成し且つ 20 蓄積させて微生物菌体と L-エピー-2-イノソースとを含有する反応液として、培養液を収得する工程と、その培養液から該微生物の菌体を除去して、L-エピー-2-イノソースを含有する反応液ろ液として、得られた培養上清液を収得する工程と、該培養上清液に直接に L-エ

ピー２－イノソースの還元のための還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤でＬ－エピー２－イノソースを還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該反応液ろ液、すなわち該培養上清液内で生成する工程と、こうして得られたところの還元反応の反応液、すなわち生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する培養上清液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とからなる請求の範囲９に記載の方法。

１５．請求の範囲９に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養して該微生物の培養液を収得し、さらに該培養液から該微生物の菌体を分離する工程と、こうして得られた微生物菌体を緩衝液または液体培地よりなる水性媒質中でミオーイノシトールと反応させて、Ｌ－エピー２－イノソースを生成させる工程と、こうして得られたところの、該微生物菌体と生成されたＬ－エピー２－イノソースとを含有する反応液から菌体を除去して、これにより、微生物菌体を除去されたがＬ－エピー２－イノソースを含有する得られた反応液ろ液を収得する工程と、このＬ－

エピー-2-イノソース含有の反応液ろ液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させて還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該反応液ろ液内で生成する工程と、こうして得られて、生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する還元反応の反応液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とからなる請求の範囲9に記載の方法。

16. 請求の範囲14または15に記載の方法における還元剤を添加してL-エピー-2-イノソースを還元剤で還元する工程を行う前に、L-エピー-2-イノソースを含有する培養上清液または反応液ろ液よりなる水性媒質のpHを、pH8～12の範囲のアルカリ性に予め調整する工程を行い、その後、L-エピー-2-イノソースを含有するpH8～12の該水性媒質に、還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加して該還元剤をL-エピー-2-イノソースに作用させて還元する反応を行い、これにより、副成されたミオーイノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシ

トールを生成させることを特徴とする、請求の範囲 1 4 または 1 5 に記載の方法。

1 7 . L - エピ - 2 - イノソースを還元するのに用いられる還元剤は、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素
5 リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化メトキシホウ素ナトリウムまたはシアン化水素化ホウ素ナトリウムである請求の範囲 9 に記載の方法。

1 8 . 用いる水性媒質は水であり、用いる還元剤が水素化ホウ素ナトリウムである請求の範囲 9 に記載の方法。

10 1 9 . ミオーイノシトールを L - エピ - 2 - イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所に F E R M B P - 7 1 6 8 の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスビー A B 1 0 1 1 9 株。

15 2 0 . ミオーイノシトールを L - エピ - 2 - イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所に F E R M B P - 7 1 7 0 の受託番号で寄託されたシュードモナス・エスビー A B 1 0 2 1 5 株。

20 2 1 . ミオーイノシトールを L - エピ - 2 - イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所に F E R M B P - 7 1 6 9 の受託番号で寄託されたエルウィニア・エスビー A B 1 0 1 3 5 株。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20 // (C12P19/02, C12R1:64), (C12P19/02, C12R1:38), (C12P19/02, C12R1:02), (C12P19/02, C12R1:18), (C12P19/02C12R1:425) (C12P19/02, C12R1:21), (C12P19/02, C12R1:01), (C12N1/20, C12R1:64), (C12N1/20, C12R1:38), (C12N1/20, C12R1:18)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CA (STN),
WPI/BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5406005, A (PICCARIELLO T.), 11 April, 1995 (11.04.95) (Family: none)	1-21
A	DE, 3405663, A (MERCK PATENT GMBH), 22 August, 1985 (22.08.85) & JP, 60-248637, A	1-21
A	EP, 477001, A (ASAHI KASEI KOGYO KK, TOYO JOZO KK), 25 March, 1992 (25.03.92) & JP, 04-126075, A & US, 5356790, A	1-21
A	Paul P Hipps et al., "Identification and Partial Characterization of Inositol:NAD ⁺ Epimerase and Inosose :NAD(P)H Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, Periplaneta americana L.", BIOCHEMISTRY, (1973), Vol.12, No.23, pp.4705-4712	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 September, 2000 (04.09.00)

Date of mailing of the international search report
12 September, 2000 (12.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/03687

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20 // (C12P19/02, C12R1:64), (C12P19/02, C12R1:38), (C12P19/02, C12R1:02),
(C12P19/02, C12R1:18), (C12P19/02, C12R1:425) (C12P19/02, C12R1:21), (C12P19/02, C12R1:01),
(C12N1/20, C12R1:64), (C12N1/20, C12R1:38), (C12N1/20, C12R1:18)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA (STN)、
WPI/BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5406005, A (PICCARIELLO T.) 11. 4月. 1995 (11. 04. 95) (ファミリーなし)	1-21
A	DE, 3405663, A (MERCK PATENT GMBH) 22. 8月. 1985 (22. 08. 85) & JP, 60-248637, A	1-21
A	EP, 477001, A (ASAHI KASEI KOGYO KK, TOYO JOZO KK) 25. 3月. 1992 (25. 03. 92) & JP, 04-126075, A & US, 5356790, A	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 09. 00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

甲斐 順子

印

4N

9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Paul P Hipps et al., "Identification and Partial Characterization of Inositol:NAD ⁺ Epimerase and Inosose:NAD(P)H Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, <i>Periplaneta americana</i> L." ,BIOCHEMISTRY, (1973), Vol. 12, No. 23, p. 4705-4712	1-21